

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2015

Irina German

# PAN-ENTEROVIRUSVASTA- AINEIDEN TESTAAMINEN IMMUNOFLUORESENSSI- MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Irina German

# PAN-ENTEROVIRUSVASTA-AINEIDEN TESTAAMINEN IMMUNOFLUORESENSSIMENETELMÄLLÄ

Opinnäytetyössä tutkittiin kaupallisten enterovirusvasta-aineiden toimivuutta ja kykyä tunnistaa tietty pikornavirustyyppi soluviljelmissä immunofluoresenssimenetelmällä (IF-menetelmä). Koska pikornavirukset ovat sekvensseiltään ja siten myös pintarakenteiltaan erilaisia, tiettyä virusta vastaan tuotetut vasta-aineet eivät välttämättä tunnista muita virustyyppieitä. Tällöin vasta-aineisiin perustuvan laaja-alaisesti tunnistavan ns. antigeeninosoitustestin kehittäminen on haastavaa. Työssä käytettiin ns. pan-enterovirusvasta-aineita, joiden pitäisi tunnistaa eri pikornavirustyyppieitä eli ne eivät ole spesifisiä yhdelle virustyyppille.

Pikornavirukset (mm. entero- ja parechovirukset) ovat hyvin pieniä vaipattomia RNA-viruksia. Nämä virukset ovat yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia. Turun Virusopin viruskokoelmista on valikoitu n. 50 pikornavirustyyppikantaa käsittäen entero- ja parechoviruksia, jotka infektoitiin valikoituihin solulinjoihin. Virusinfektiota seurattiin sytopaattisen vaikutuksen perusteella valomikroskooppilla. Infektoituvuuden perusteella sopivimmat virukset valittiin lisäykseen ja vasta-ainekokeisiin. Työssä testattiin useita kirjallisuudessa mainittuja solulinjoja kuten RD, A549, B-vero, HT29 ja MRC5 ja näistä valittiin kullekin virustyyppille sopivin solulinja. Työssä testattiin Meridian Monoclonal Ab EV5 to Enterovirus, Meridian Monoclonal Ab to Enterovirus VP1 ja Dako 5-D8/1 Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus pan-enterovirusvasta-aineita pikornavirusten tunnistamiseksi infektoiduista soluista. Työ tehtiin infektoimalla soluja ja fiksoimalla solut ennen vasta-aineväriäystä. Kuvantamiseen käytettiin Turun yliopiston kuvantamiskeskuksen (Turku BioImaging) AxioVert 200M mikroskooppi.

Tulokset osoittivat, että Meridian EV5 ja VP1 vasta-aineiden tunnistusprofiili on laajempi kuin Dako vasta-aineen. Vasta-aine Meridian EV5 tunnisti coxsackievirus B1-5 -virustyyppieitä, ja echovirus E-2,-12,-13,-16,-17,-20 -virustyyppieitä. Meridian VP1 tunnisti samat virustyyppit ja lisäksi coxsackievirus A13-virustyyppieitä. Dako tunnisti edelleen coxsackievirus B1-5 virustyyppieitä ja echovirus E-9,-12,-16 ja -17 virustyyppieitä. Vasta-ainekokeiden aikana havaittiin että MRC5-soluilla käytetyt pikornavirusvasta-aineet Meridian EV5 ja Meridian VP1 antoivat mikroskooppilla vihreän taustan, minkä takia virukset ja vasta-aineet tarkistettiin A549- ja RD-soluilla. Työn tuloksia voidaan soveltuvin osin käyttää pikornavirusdiagnostiikassa esim. kehitettäessä antigeeninosoitustestiä.

## ASIASANAT:

Enterovirus, immunofluoresenssimenetelmä, pan-enterovirusvasta-aineet, parechovirus, pikornavirukset.

Irina German

## DETECTION OF HUMAN PICORNAVIRUSES BY IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY USING PAN-ENTEROVIRUS ANTIBODIES

The purpose of this thesis was to test the ability of commercially available pan-enterovirus antibodies to detect different Picornavirus types in cell lines by immunofluorescence assay (IFA). Picornaviruses (enteroviruses and parechoviruses) are small, non-enveloped, positive-stranded RNA viruses. They are the most common human pathogens, which cause diseases like respiratory tract illnesses, hand, foot, and mouth disease, aseptic meningitis and other infections. Selected entero- and parechoviruses were grown in different cell lines including RD, A549, MRC5 and HT29. Infectivity of viruses (measured as formation of cytopathic effect (CPE) in cell cultures) was determined before IFA using a light microscope. The following pan-entero antibodies were used: Meridian Monoclonal Antibody EV5 to Enterovirus, Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus VP1 and Dako 5-D8/1 Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus. Antibody Meridian EV5 detected coxsackievirus B1-5 serotypes, and echovirus E-2,-12,-13,-16,-17,-20 –serotypes and antibody Meridian VP1 detected the same serotypes and also coxsackievirus A13 while antibody Dako 5-D8/1 detected coxsackievirus B1-5 and echovirus E-9,-12,-16 and -17 serotypes. There was also significant background staining when antibodies Meridian EV5 and VP1 were used in MRC5 cell line. In all, the pan-enterovirus antibodies detected coxsackievirus B1-5 and echovirus E-12,-16 and -17 serotypes. None of the antibodies gave positive result against human rhinoviruses or parechoviruses. In pan-enterovirus antibodies are to be used in other assay formats, the performance must be empirically determined for false positivity due to background staining. The work was carried out in the Department of Virology, University of Turku in AIROPico project.

### KEYWORDS:

Enterovirus, immunofluorescence assay, pan-enterovirus antibody, parechovirus, picornaviruses.

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET</b>	<b>6</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>7</b>
<b>2 PIKORNAVIRUKSET JA IF</b>	<b>8</b>
2.1 Virusgenomin rakenne ja pintaproteiinit	9
2.2 VP1-proteiini, pan-enterovirusvasta-aineet ja IF	10
<b>3 MENETELMÄT</b>	<b>13</b>
3.1 Soluviljely	13
3.2 Viruskokeet	14
3.3 Immunofluoresenssi	14
<b>4 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET</b>	<b>17</b>
4.1 Solujen kasvatus	17
4.2 Virusinfektiot, virustitraus ja titraustulokset	20
4.3 Pan-enterovasta-aineiden testaukset	21
4.4 Kvanttaminen	23
<b>5 TULOKSET</b>	<b>24</b>
5.1 Tulokset	24
5.2 IF-kuvat	26
5.2.1 Positiiviset IF-kuvat	28
<b>6 PÄÄTELMÄT</b>	<b>31</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>33</b>

## LIITTEET

- Liite 1. Pikornavirukset
- Liite 2. IF-ohjeet
- Liite 3. Zeiss Axiovert 200M käyttöohjeet
- Liite 4. IF-kuvat

## KUVAT

Kuva 1 Pikornavirusgenomi	10
Kuva 2 Pikornaviruksen rakenne ja VP-proteiinien sijoittuminen rakenteessa	10
Kuva 3 Esimerkki Zeiss Axiovert M200-mikroskoopilla otetusta kuvasta	14
Kuva 4 Suora (a) ja epäsuora (b) immunofluoresenssimenetelmä	15
Kuva 5 Alexa Fluor® 488-aineen fluoresenssi-Ex/Em-spektri	16
Kuva 6 Hoechst 33342 fluoresenssi Ex/Em spektri	16
Kuva 7 Työn prosessikuvio.	17
Kuva 8 Zeiss PrimoVert valomikroskooppi, Turun Yliopisto, 140509, IG.	18
Kuva 9 Solut, Zeiss PrimoVert valomikroskooppi.	19
Kuva 10 Perkin-Elmer Vision Plate 96.	21
Kuva 11 Esimerkki pipetointikaaviosta.	22
Kuva 12 Zeiss Axiovert 200M -käänteismikroskooppi	23
Kuva 13 Esimerkki positiivisesta tuloksesta.	26
Kuva 14 Esimerkki taustakuvasta.	27
Kuva 15 Esimerkki negatiivisesta kuvasta.	27
Kuva 16 Positiiviset tulokset: CV-B1-5_Meridian EV5_Meridian VP1_Dako 5-D8/1.	29
Kuva 17 Positiiviset tulokset: CV-A13_Meridian VP1.	29
Kuva 18 Positiiviset tulokset: E-2,-12,-13,-16,-17,-20_Meridian EV5_Meridian VP1.	30
Kuva 19 Positiiviset tulokset: E-9,-12,-16,-17_Dako 5-D8/1.	30

## TAULUKOT

Taulukko 1 Enterovirus-suku	8
Taulukko 2 Pan-enterovirusvasta-aineet	12
Taulukko 3 Solujen hoito-ohjeet	18
Taulukko 4 Virustitrauksen tulokset	21
Taulukko 5 Tulokset	25

## KÄYTETYT LYHENTEET

A549	ihmisen keuhkoepiteelisyöpäsolulinja
BSA	naudan seerumin albumiini
B-vero	viherapinan munuaisen epiteelisolulinja
CPE	sytopaattinen vaikutus
CV-A	coxsackievirus A
CV-B	coxsackievirus B
E	echovirus
EV	enterovirus
FCS	vasikan seerumi
HEV	ihmisen enterovirus (human enterovirus)
HPeV	ihmisen parechovirus
HRV	rinovirus
HT29	ihmisen paksusuolen adenokarsinoomasolulinja
IF	immunofluoresenssi
MRC5	ihmisen keuhkojen fibroplastisolulinja
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
RD	ihmisen lihassyöpäsoluja
RNA	ribonukleiinihappo

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö suoritettiin Turun yliopistolla, Lääketieteellisessä tiedekunnassa, Virusopilla. Opinnäytetyön tulokset ovat julkisia ja ne voidaan julkaista osana opinnäytetyötä. Työn tarkoituksena oli tutkia kaupallisten Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus #C01669M, Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus VP1 #C01289M ja Dako 5-D8/1 Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus #M 7064 pikornavirusvasta-aineiden toimivuutta ja kykyä tunnistaa tietty pikornavirus-tyyppi soluviljelmissä. Tutkimusmenetelminä käytettiin immunosytokemiaa. Menetelmän erityispiirre on se, että perinteisten objektilasien sijasta käytettiin kuvannettavia 96-kuoppalevyjä eli solujen kasvatus, fiksaus ja kuvantaminen tapahtui kasvatuslevyjen kuvannettavan pohjan läpi.

Entero- ja parechovirukset ovat yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia. Ne aiheuttavat mm. ihottumatauteja, hengitystieinfektiota, enterorokkoa (hand-foot-mouth disease), aivokalvotulehdusta ja sydänlihastulehdusta. Entero- ja parechovirukset kuuluvat *Pikornavirus*-perheeseen, *Picornaviridae* -heimoon. Pikornavirukset ovat pallomaisia, hyvin pieniä ja vaipattomia viruksia joiden genomi muodostuu positiivissäikeisestä, yksinauhaisesta RNA:sta. Pikornavirukset ovat sekvensseiltään ja siten myös pintarakenteiltaan erilaisia ja tällöin laaja-alaisesti tunnistavien monoklonaalisten vasta-aineiden kehittäminen on haastavaa. (picornaviridae.com, 2014)

Työ tehtiin infektoimalla soluja ja fiksoimalla solut ennen vasta-ainevärjäystä. Solumäärän ja IF:n suhdetta tarkasteltiin työn alkuvaiheissa ja sen myötä löydettiin optimaaliset olosuhteet IF-värjäyksille. Entero- ja parechovirusia infektoitiin valikoituihin solulinjoihin ja infektiota seurattiin sytopaattisen vaikutuksen perusteella valomikroskoopilla. Infektoituvuuden perusteella sopivimmat virukset valittiin vasta-ainekokeisiin. Näytteiden kuvantamiseen ja tuloksien tarkasteluun käytettiin Turun yliopiston kuvantamiskeskuksen fluoresenssimikroskooppia. Mikroskoopin käyttöön saatiin asianmukainen perehdytys ennen työn aloittamista. Kuvat tallennettiin sekä alkuperäisessä \*zvi- että \*tiff-muodossa ja käsiteltiin Photoshopilla.

## 2 PIKORNAVIRUKSET JA IF

Entero- ja parechovirukset kuuluvat *Pikornavirus*-perheeseen ja ne ovat yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia. Enterovirukset voivat aiheuttaa aivokalvotulehdusta, sydänlihastulehdusta, hengitystieinfektiota, enterorokkoa (hand-foot-mouth disease) ja muita ihottumatauteja. Rinovirus on yleisin tavallisen nuhakuumeen aiheuttajapatogeeni. Parechovirukset aiheuttavat pahimmillaan vastasyntyneen vakavan keskushermostoinfektion. Nykyisin tunnetaan yli 250 ihmisiä infektoivaa pikornavirustyyppiä. (picornaviridae.com, 2014; picornastudygroup.com, 2014.)

Enterovirus-sukuun kuuluu 12 lajia (taulukko 1):

Taulukko 1 *Enterovirus*-suku

Nykyinen lajin nimi	Entinen lajin nimi
Enterovirus A	Human enterovirus A
Enterovirus B	Human enterovirus B
Enterovirus C	Human enterovirus C
Enterovirus D	Human enterovirus D
Enterovirus E	Bovine enterovirus (group A)
Enterovirus F	Bovine enterovirus (group B)
Enterovirus G	Porcine enterovirus B
Enterovirus H	Simian enterovirus A
Enterovirus J	Unclassified simian viruses
Rhinovirus A	Human rhinovirus A
Rhinovirus B	Human rhinovirus B
Rhinovirus C	Human rhinovirus

Nykyisen ryhmittelyn mukaan rinovirukset kuuluvat myös taksonomisesti *Enterovirus*-sukuun. *Enterovirus*-sukuun kuuluvat mm. polio-, coxsackie-, echo ja rinovirukset. Enterovirus A -laji sisältää 24 serotyyppiä. Enterovirus B -laji sisältää 61 serotyyppiä. Enterovirus C -laji sisältää 23 serotyyppiä ja Enterovirus D -laji sisältää 5 serotyyppiä. Human rhinovirus (HRV) 87 on luokiteltu uudelleen EV-D68

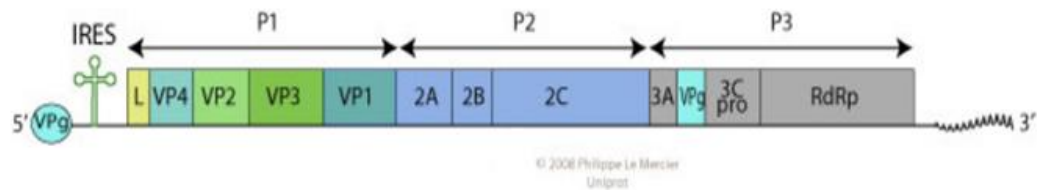


kannaksi. Rinovirus A sisältää 80 serotyyppiä ja rinovirus B sisältää 32 serotyyppiä. Rinovirus C-laji on siitä erikoinen laji, että siihen kuuluvat virustyyppit eivät lisäännä yleisesti käytössä olevissa solulinjoissa, ja sen takia niitä ei käytetty tässä työssä. *Parechovirus*-sukuun kuuluu tällä hetkellä vain kaksi lajia: Ihmisen parechovirus ja Ljungan virus. Ihmisen parechovirusiin kuuluu 16 tyyppiä. (picornaviridae.com, 2014; picornastudygroup.com, 2014.)

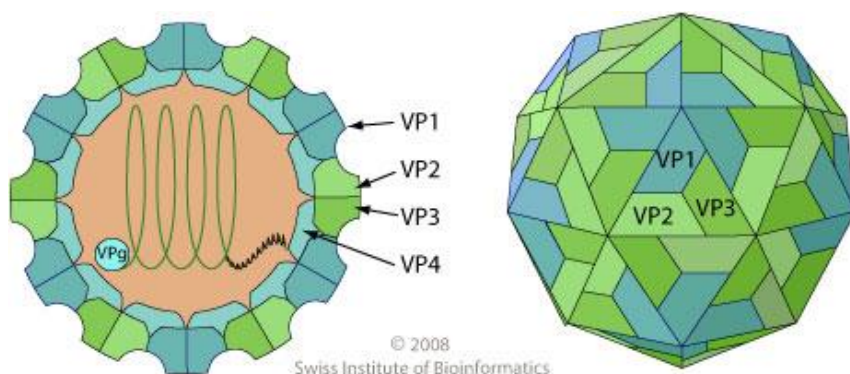
## 2.1 Virusgenomin rakenne ja pintaproteiinit

Pikornavirukset ovat pallomaisia, hyvin pieniä, vaipattomia RNA-viruksia. Pikornavirusten genomi muodostuu positiivisesta, yksinauhaisesta RNA:sta, joka toimii samaan tapaan kuin solujen lähetti-RNA (mRNA). Kapsidin koko on noin 27–30 nm, joka koostuu 60 samanlaisesta rakenneyksiköstä. Genomin pituus on keskimäärin 7200–8500 emäsparia (bp). Pikornavirusten replikaatio tapahtuu infektoidun solun sytoplasmassa. Translaatiossa virusten lähetti-RNA tuottaa ison polyproteiinin joka ennen synteessin loppua pilkkoutuu yksittäisiksi proteiineiksi, joita tarvitaan virusten lisääntymiseen. (picornaviridae.com, 2014; ViralZone.org, 2014.)

Virusgenomin 5'- ja 3'- päissä on UTR (untranslated region) alueet. Genomin 5'-päähen on kovalenttisesti liitetty pieni proteiini nimeltä VPg. 5'-pään pitkä UTR alue sisältää genomin sisäisen ribosomien sitoutumisalueen (internal ribosome entry site (IRES)). Genomin 3'-puoleisessa päässä on pitkä polyA-häntä (Kuva 1). Genomin 5'-pään puoleinen P1-alue koodaa rakenteellisia proteiineja, joita kutsutaan VP1-, VP2-, VP3- ja VP4-proteiineiksi (Kuva 2). VP1-VP3 muodostavat kuoren ulkopinnan ja VP4 sijaitsee kuoren sisäpuolella. P2- ja P3- alueet koodaavat ei-rakenteellisia proteiineja, joita tarvitaan lisääntymiseen. Kuorella on aminohappoalueita, joiden avulla virukset tarttuvat solupinnan reseptoreihin ja pääsevät solun sisään. Pikornavirusreseptorit ovat keskeisiä solujen kiinnittymisessä, signaalin välittämisessä ja endosytoosissa ja niitä tunnetaan yli kymmenen. (Tuthill ym. 2010, 43–89; picornaviridae.com, 2014; picornastudygroup.com, 2014; ViralZone.org, 2014.)



Kuva 1 Pikornavirusgenomi (Lähde: ViralZone:[www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics, 2014).



Kuva 2 Pikornaviruksen rakenne ja VP-proteiinien sijoittuminen rakenteessa (Lähde: ViralZone:[www.expasy.org/viralzone](http://www.expasy.org/viralzone), Swiss Institute of Bioinformatics, 2014).

## 2.2 VP1-proteiini, pan-enterovirusvasta-aineet ja IF

Kuoren VP1-proteiini on yksi rakenteellisista proteiineista jonka antigeeninen homologia on hyvin tutkittu. Aiemmat tutkimukset osoittivat että EV VP1-proteiini sisältää runsaasti antigeenisia alueita eli epitoppeja. Tämä havainto viittaa siihen että VP1-proteiinia voidaan käyttää pikornaviruksia tunnistavien vasta-aineiden kehittämisessä. Vasta-aineita kehitetään perinteisin menetelmin (hiirissä tuottavat monoklonaaliset vasta-aineet), valmistamalla täyspitkä rekombinanttiproteiineja VP1 joita käytetään immunogeeninä hybridoomatuotantoa varten. Vasta-aineiden seulomiseen käytetään ns. synteettisiä vasta-ainekirjastoja. IF-menetelmä on käyttökelpoinen seulontamenetelmä monoklonaalisten vasta-aineiden tunnistamiseen. IF-menetelmällä voidaan myös osoittaa antigeenejä (entero- ja

parechovirukset) fiksatuista soluista käyttämällä monoklonaalisia pan-enterovirusvasta-aineita, mutta tiettyä virusta vastaan tuotetut vasta-aineet eivät välttämättä tunnista muita virustyypppejä. IF-menetelmä on nopea ja edullinen seulontamenetelmä mikä laajasti käytetään diagnostisissa tutkimustöissä EV tyyppitykseen käyttämällä ryhmäspesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, mutta virusten muuntuminen sekvenssitasolla luovat merkittävän haasteen antigeeninosoitustestien kehittämiseen. (Samuelson ym. 1995, 385–386; Terletskaia-Ladwig ym. 2008, 1000–1006; Barbani ym. 2009, 245–248; Miao ym. 2009, 3108–3113.)

Työssä käytettiin monoklonaalisia pan-enterovirusvasta-aineita Meridian Monoclonal Antibody EV5 to Enterovirus #C01669M (Meridian EV5), Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus VP1 #C01289M (Meridian VP1) ja Dako 5-D8/1 Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus #M 7064 (Dako 5-D8/1), jotka reagoivat VP1 polypeptidin kanssa ja joiden oletettiin tunnistavan useita pikornavirustyypppejä. Vasta-aineiden Dako 5-D8/1 ja Meridian VP1 tuotannossa käytettiin lämpöinaktivoitu ja puhdistettu coxsakievirus B5 virusta ja Meridian EV5 tuotannossa EV viruslysaatti (taulukko 2). Virusvasta-aineet tuotettiin hiirissä ja puhdistettiin kromatografian avulla.

Pan-enterovirusvasta-aineiden ja muiden työssä käytettyjen vasta-aineiden tunnistamiseen käytettiin hiirissä ja kaneissa tuotettuja kaupallisia sekundaarivasta-aineita. Hiirissä tuotettu Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) ja kaneissa tuotettu Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) vasta-aineet on leimattu fluoresoivalla Alexa Fluor®488 -väriaineella.([www.meridianlifescience.com](http://www.meridianlifescience.com), 2014; [www.dako.com](http://www.dako.com), 2014; [Lifetechnologies.com](http://Lifetechnologies.com), 2014.)

Taulukko 2 Pan-enterovirusvasta-aineet

Cat #	<b>Meridian mAb EV5 to Enterovirus</b> C01669M	<b>Meridian mAb to Enterovirus VP1</b> C01289M	<b>Dako 5-D8/1 Anti-Enterovirus</b> M 7064
Kuvaus	Reagoi VP1 peptidin kanssa. Tunnistaa useat enterovirus tyyppejä (Ei reaktiota: ECHO 34, EV70 ja EV71)	Reagoi VP1 peptidin kanssa. Tunnistaa useat enterovirus tyyppejä (Ei reaktiota: RV A1)	Reagoi VP1 peptidin kanssa. Tunnistaa useat enterovirus tyyppejä (Ei reaktiota: RV A1)
Kloon	B1485M	B324M	Clone 5-D8/1
Eläin	Hiiri	Hiiri	Hiiri
Isotyyppi	IgG3	IgG2a	IgG2a
Vasta-aineen tuottamisessa käytetty immuogeeni	Enterovirus virus-lysaatti	Lämpöinaktivoitu puhdistettu coxsackievirus B5	Lämpöinaktivoitu puhdistettu coxsackievirus B5

## 3 MENETELMÄT

### 3.1 Soluviljely

Soluviljely tarkoittaa solujen kasvattamista hallituissa soluviljelylaboratorio-olosuhteissa. Laboratorio-olosuhteissa solut tarvitsevat tarkasti säädellyn ympäristön ravintoaineiden, lämpötilan ja pH-arvon suhteen. Eläinsolut kasvatetaan yleensä erityisessä CO<sub>2</sub>-kaasupitoisuudessa, joka ylläpidetään soluviljelyinkubaattorissa. Soluja voidaan kasvattaa liuoksessa yksittäisinä soluina tai soluryppäinä tai kasvatusalustan pinnalla, jossa ne yleensä muodostavat yksisolukerroksen (engl. monolayer). Jatkoviljelyä varten, pintaan kiinnittyneet solut irrotetaan kasvualusta trypsinoimalla trypsiini-EDTA liuoksella tai muulla proteaasikäsittelyllä ja tarvittaessa pulloa koputtelemalla tai soluja raaputtamalla. (Tuomi, 2014; Solunetti.fi, 2014.)

Soluja tarvitsee jakaa säännöllisin ajoin. Normaalit solut jakautuvat rajallisesti ja solusyklien edetessä ne vanhenevat ja kuolevat. Tämän vuoksi useimmiten tutkimuksissa käytetään geneettisesti muokattuja eli transformoituja jatkuvasti jakautuvia solulinjoja, jotka käyttäytyvät kasvainsolumaisesti, ja/tai syöpäsolulinjoja niiden nopean kasvun (kahdentumisaika 12 - 36 h) ja kuolemattomuuden vuoksi. Soluviljelmää tarkistellaan silmämääräisesti ja mikroskoopilla mahdollisen kontaminaation havaitsemiseksi ja jatkoviljelytarpeen selvittämiseksi. (Tuomi, 2014.)

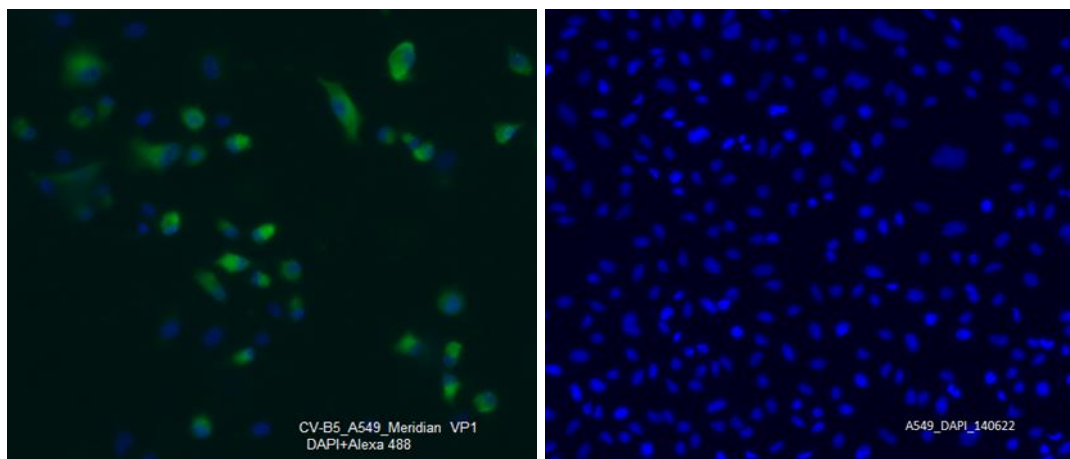
Tässä työssä testattiin useita kirjallisuudessa mainittuja solulinjoja kuten ihmisen lihassyöpäsoluja (RD), ihmisen keuhkoepiteelisyöpäsoluja (A549), viherapinan munuaisen epiteelisoluja (B-vero), ihmisen keuhkojen fibroplastisoluja (MRC5) ja ihmisen paksusuolen adenokarsinoomasoluja (HT29) ja näistä solulinjoista valittiin kullekin virustyyppille sopivin solulinja. Suurin osa enteroviruksista kasvaa hyvin A549, RD ja B-vero soluilla. MRC5 solut sopivat enterovirus viljelyyn, mutta IF-värjäyksessä aiheuttavat häiritsevän taustan. Parechovirus viljelyyn käytetään HT29 soluja. (Perez-Ruiz ym. 2003, 789–791; Terletskaia-Ladwig ym. 2008, 1000–1006; Barbani ym. 2009, 245–248.)

### 3.2 Viruskokeet

Virusviljelyssä virus infektoidaan soluviljelmään ja virusinfektiota seurataan sytopaattisen vaikutuksen perusteella valomikroskoopilla. Sytopaattinen vaikutus eli CPE (engl. cytopathic effect) tarkoittaa viruksien soluja vaurioittavaa vaikutusta. Viruksien lisääntyessä soluissa tapahtuu morfologisia muutoksia kuten pyöristymistä ja irtoamista. (Therapiafennica.fi, 2014.) CPE:n muodostuminen oli keskeinen kriteeri virustyyppin käyttämiselle vasta-ainekokeissa. (Perez-Ruiz ym. 2003, 789–791; Leonardi ym. 2009, 426–428.)

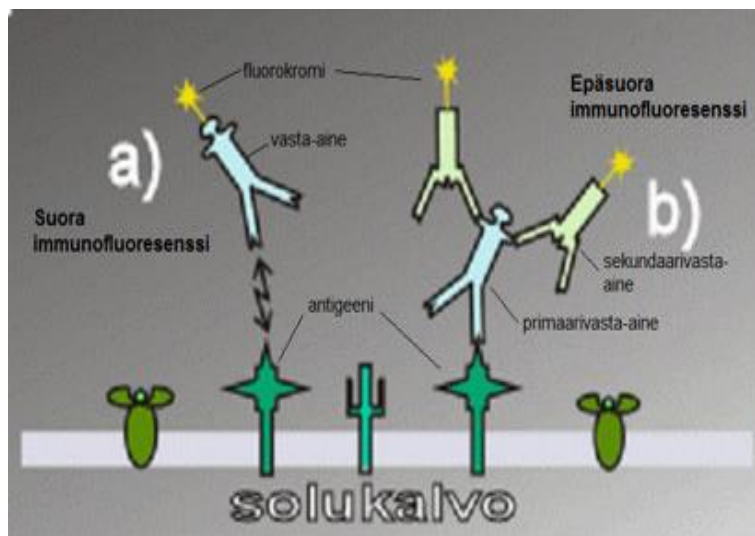
### 3.3 Immunofluoresenssi

IF-menetelmien avulla osoitetaan haluttuja proteiineja tai antigeeneja fiksatuista soluista tai kudosleikkeistä käyttämällä vasta-aineita, joihin on liitetty fluoresoiva merkkiaine eli fluorokromi (Kuva 3). Fluorokromit absorboivat tietty lyhytaaltoista valoa (yleensä UV-valoa) ja vapauttavat osan energiasta pidempinä, näkyvinä valon aallonpituuksina eli fluoresenssina, joka voidaan havaita fluoresenssi- tai konfokaalimikroskoopilla käyttämällä erilaisia suodattimia. (Barbani ym. 2009, 245–248; Solunetti, 2014.)



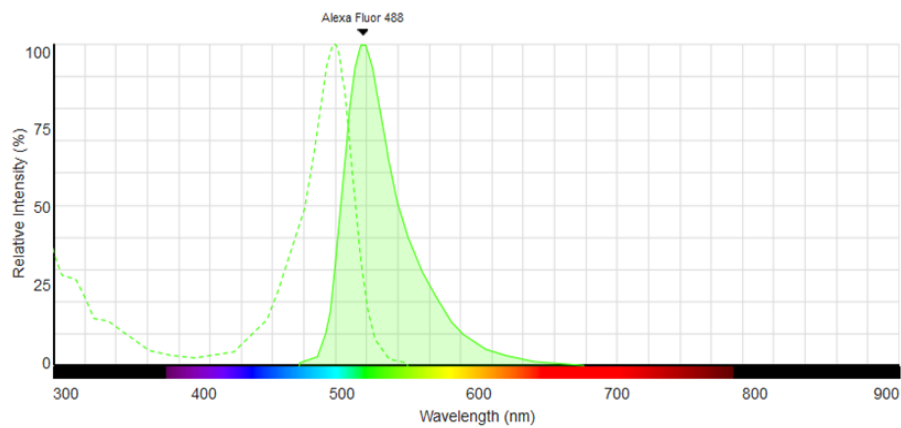
Kuva 3 Esimerkki Zeiss Axiovert M200-mikroskoopilla otetusta kuvasta, jossa kohdat, joihin fluorokromi on sitoutunut, erottuvat kirkkaan värisinä tummaa taustaa vasten. Suurennos: 10x.

IF-värjäys voidaan suorittaa joko suoralla tai epäsuoralla menetelmällä (Kuva 4). Samasta näytteestä voidaan osoittaa useampia antigeeneja käyttämällä eri fluorokromeilla leimattuja sekundaarivasta-aineita. Suorassa värjäysmenetelmässä käytettävä vasta-aine on leimattu, joten kohdeantigeeni havaitaan yhdellä käsittelyllä. Epäsuorassa menetelmässä tutkittavan antigeenin tunnistus tapahtuu primaarisella vasta-aineella, joka ei sisällä merkkiainetta. Primaarisen vasta-aineen sitoutuminen osoitetaan sekundaarisella vasta-aineella, joka on leimattu fluoresoivalla merkkiaineella. (P. Susi, 2014; Solunetti, 2014.)

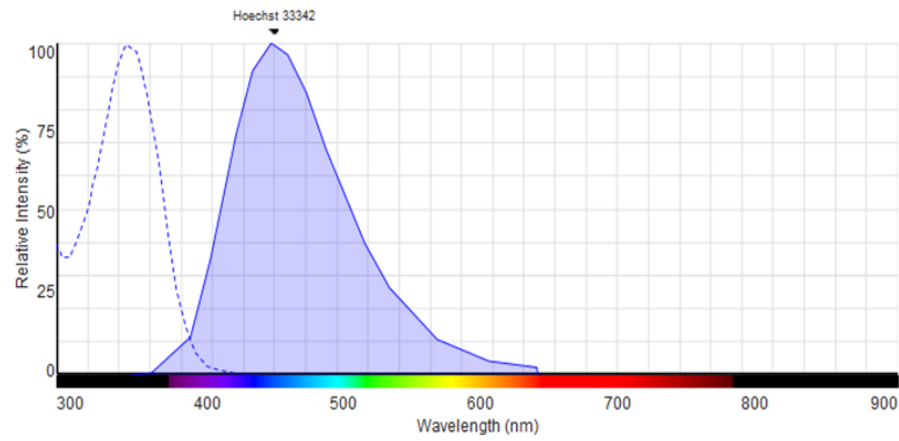


Kuva 4 Suora (a) ja epäsuora (b) immunofluoresenssimenetelmä (Lähde: [www.solunetti.fi](http://www.solunetti.fi), 2014, muokattu).

Tutkimuksessa testattiin primaarisia hiiren monoklonaalisia pikornavirusvasta-aineita Meridian EV5, Meridian VP1 ja Dako pikornavirusten tunnistamiseksi infektoiduista soluista. Vasta-aineiden sitoutuminen osoitettiin käyttämällä hiirissä ja kaneissa tuotettuja kaupallisia sekundaarivasta-aineita. Vasta-aineet on leimattu fluoresoivalla Alexa Fluor® 488 – väriaineella (Kuva 5). Alexa Fluor® 488 on kirkas, vihreä fluoresenssiväriaine, jonka maksimaalinen viritysaallonpituus on 488 nm ja emissioaallonpituus on 525 nm. Tumavärjäykseen käytettiin sinistä fluoresenssiväriainetta Hoechst 33342 (Kuva 6). Hoechst 33342 vasta-aine sitoutuu solun DNA:han, ja väriainetta käytetään solujen tumavärjäykseen. Se on kirkas, sininen fluoresenssiväriaine jonka eksitaatioaallonpituus on max. 350 nm ja emissioaallonpituus on max. 461 nm. (Lifetechnologies.com, 2014)



Kuva 5 Alexa Fluor® 488-aineen fluoresenssi-Ex/Em-spektri (Lähde: [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com), 2014).



Kuva 6 Hoechst 33342 fluoresenssi Ex/Em spektri (Lähde: [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com), 2014).



## 4 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

Kokeellinen työ piti sisällään seuraavia työvaiheita: soluviljely, virusinfektiot, vasta-ainekokeet ja IF-mikroskopointi. Prosessikaavio on esitetty kuvassa 7.



Kuva 7 Työn prosessikuvio.

### 4.1 Solujen kasvatatus

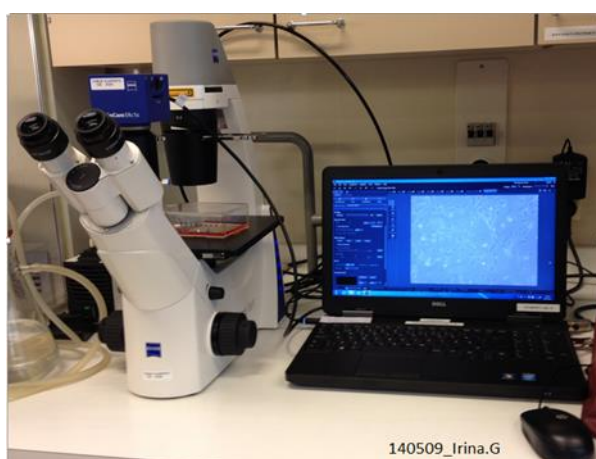
Työssä viljeltiin viittä eri solulinjaa: RD, A549, B-vero, HT29 ja MRC5. Solut viljeltiin inkubaattorissa 37 °C asteessa ja 5 %:ssa CO<sub>2</sub> pitoisuudessa T-75-pulloissa ja T-175-pulloissa ja virusinfektioiden varten 96-kuoppalevyissä. Mediumiin lisättiin vasikan seerumia FCS (engl. Fetal Calf Serum), antibioottia ja tarvittaessa glutamiinia (taulukko 3). Ennen solujen irtoamista solukerros huuhdeltiin PBS liuksella. Solut irrotettiin alustasta 0,25 % trypsiiniliuksella tai 0,25 % trypsiini + 0,02 % versene (EDTA) liuksella (taulukko 3). Solujen irtoamiseen kuuluva aika vaihteli solulinjasta riippuen ja trypsiiniliuksen käyttökerroista. Solut jaettiin niiden jakosuhteiden mukaan esim. A549 solulinjan jakosuhte 1:4, niin 5 ml solususpensiota ja 20 ml tuoretta mediumia jaettiin T-75 pulloon.

Soluja jaettiin kaksi kertaa viikossa. Virusinfektioiden ja virusvasta-ainetestauksia varten solut jaettiin 96-kuoppalevyille. Viruksien infektiokyvyn tarkistamista varten käytettiin valkoisia, läpinäkyviä kuoppalevyjä. Valkoiselle kuoppalevyille laitettiin seuraavat solumäärät: 40 000 solua/kuoppa (200 µl/kuoppa), joten yön inkuboinnin jälkeen kuopan pohjaan muodostui tasainen yksisolukerros. Virusvasta-ainetestauksiin käytettiin erityisiä mustia 96-kuoppalevyjä, joissa on kuvannettava, kirkaspohja. Tähän vaiheeseen soluja käytettiin 20 000 solua/kuoppa, jotta yön yli jatkuneen kasvatuksen jälkeen solujen konfluenssiaste olisi n. 40 %.

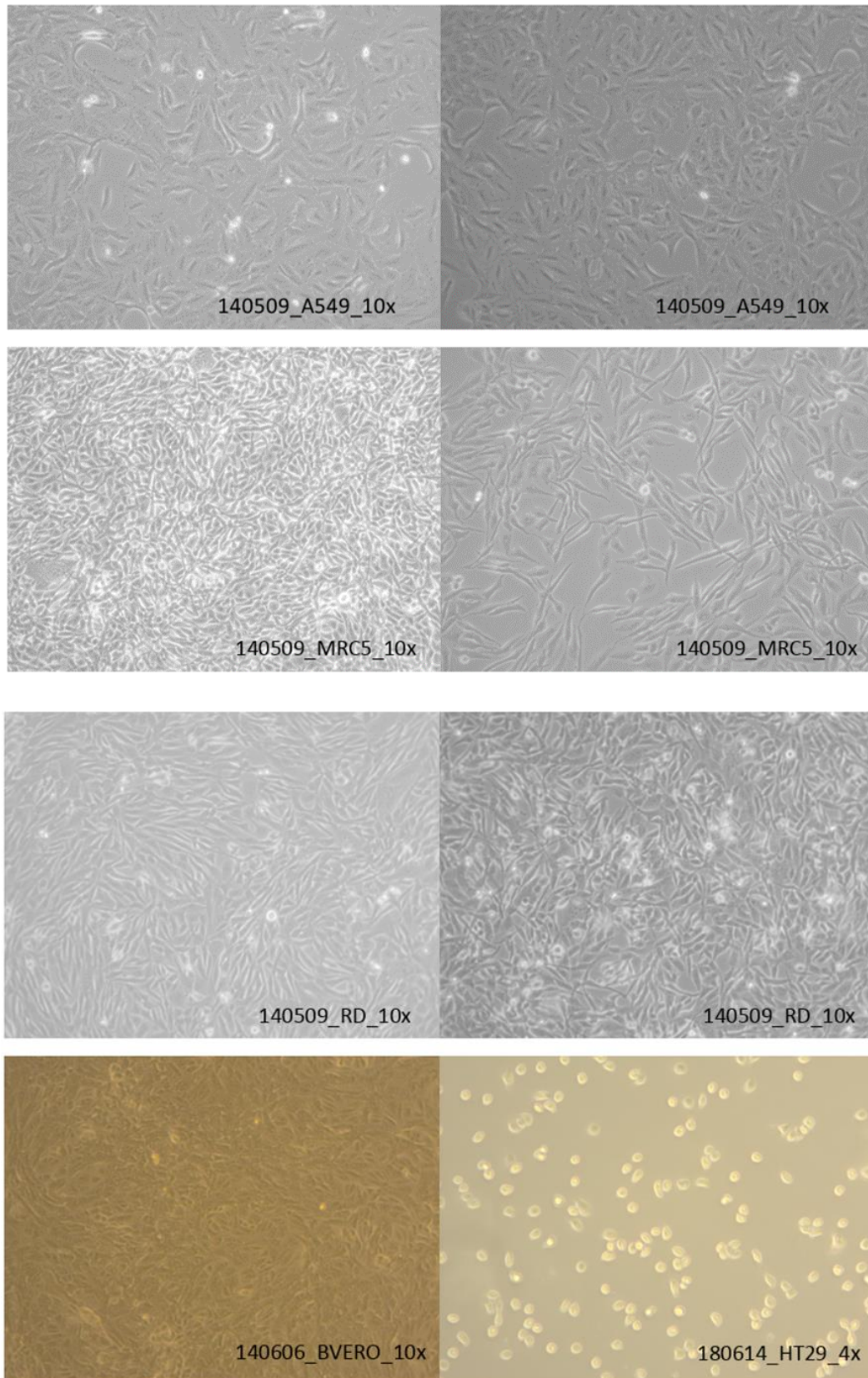
Taulukko 3 Solujen hoito-ohjeet

Solulinja	Irtoaminen	Medium ja antibiootti	Jako-suhde
<b>A549</b> (lung carcinoma)	0,25 % trypsiini + 0,02 % versene (1:1)	HAMF12 + 7 % FCS + gentamycin	1:4
<b>RD</b> (rhabdomyosarcoma)	0,25 % trypsiini	DMEM + 7 % FCS + 2 mM L-glu- tamiini + gentamycin	1:4
<b>MRC-5</b> (lung fibroblast)	0,25 % trypsiini + 0,02 % versene (1:1)	DMEM + 10 % FCS + gentamycin	1:10
<b>HT29</b> (adenocarcinoma)	0,25 % trypsiini + 0,02 % versene (1:1)	DMEM + 10 % FCS + gentamycin	1:5
<b>BVERO</b> (kidney epithelial)	0,25 % trypsiini	M199 + 5 % FCS + gentamycin	1:4

Soluviljelmää tarkasteltiin Zeiss PrimoVert – valomikroskoopilla. Tämän mikroskoopin avulla pystyttiin ottamaan kuvia soluista, koska mikroskooppiin on asennettu kamera, joka on kytketty tietokoneeseen (Kuva 8). Kuvien oikeassa alakulmassa lukee kuvauspäivämäärä, solulinjan nimi ja objektiivin suurennus (Kuva 9). Solutiheys laskettiin GWB Olympus valomikroskoopilla käyttäen Bürker-kammiota seuraavan kaavan mukaan: Solutiheys = Solumäärä (keskiarvo/ruutu) x Laimennoskerroin x  $10^4$ .



Kuva 8 Zeiss PrimoVert valomikroskooppi, Turun Yliopisto, 140509, IG.



Kuva 9 Solut, Zeiss PrimoVert valomikroskooppi.

## 4.2 Virusinfektiot, virustitraus ja titraustulokset

Työvaiheen tarkoituksena oli testata eri soluissa kasvaneiden viruksien infektiivisyyttä. Viruskokeiden varten virusopin viruskokoelmista valikoitiin n. 50 virustyyppikantaa: coxsackie A, coxsackie B, echo-, entero-, rino- ja parechovirusia (Liite 1 Pikornavirukset). Tähän vaiheeseen solut viljeltiin läpinäkyvissä 96-kuoppalevyissä.

Virusinfektiota seurattiin sytopaattisen vaikutuksen (CPE) perusteella valomikroskoopilla. Virusinfektioiden etenemistä seurattiin päivittäin 3 päivän ajan. Virusinfektioita tehtiin yhteensä neljä kertaa. Virus infektoitiin ja kasvatettiin soluilla ja kun positiivinen CPE oli havaittavissa, virusta voitiin käyttää IF-kokeissa. Suurin syy tällaiseen oli se, että meillä ei ollut käytössä kontrollivasta-aineita, joilla kaikki käytetyt virukset olisi voinut tunnistaa.

Solut jaettiin 96-kuoppalevyille ja inkuboitiin yön yli täyteen konfluenssiin. Virusinfektiota varten vanha medium poistettiin ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin uutta lämmintä mediumia 100 µl. Virusnäytettä pipetoitiin 10 µl kuoppalevyyn ensimmäiseen kuoppaan, josta virus jaettiin 1:10 laimennossarjana seuraaville kuoppariveille haravapipetillä. Muutamia kuoppia jätettiin aina infektoimatta, jotta voitiin nähdä, miltä solukko näyttää ilman virusta. Soluja inkuboitiin 37 °C asteessa.

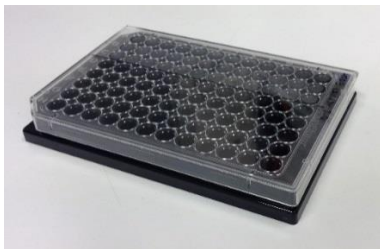
Enterovirukset: coxsackievirus B CV-B1-5; coxsackievirus A CV-A1-7, CV-A9-18, CV-A20-22, CV-A24; echovirus E-1-2, E-4-E-9, E-11-13, E-16-17, E-19-23, E-25-27, E-20, E-31-34, Rigvir E-7 ja enterovirus EV-8, EV-68, EV-71 testattiin A549, RD ja MRC-5 soluilla. Virukset jotka eivät kasvaneet näillä soluilla tarkistettiin B-vero-soluilla ja saatiin sama tulos. Vika voi olla mahdollisesti viruksissa, koska niitä oli säilytetty pitkään pakkasessa ja ne eivät välttämättä olleet säilyttäneet infektiivisyyttään. Rinovirukset HRV-1- 3, 12, 14, 16, 26, 80, 99 ja parechovirukset: parechovirus HPeV-1-6 viljeltiin HT29-soluilla. Rinovirukset eivät infektoineet HT29-soluja ja niitä päätettiin siksi olla käyttämättä vasta-ainekokeissa. Infektoituvuuden perusteella taulukossa 4 listatut virukset valittiin vasta-ainekokeisiin.

Taulukko 4 Virustitrauksen tulokset

virus	A549	RD	MRC5	virus	A549	RD	MRC5	virus	HT29
CV-B1	x		x	E-1	x		x	HPeV-1	x
CV-B2	x		x	E-2	x		x	HPeV-1	x
CV-B3	x			E-5	x		x	HPeV-2	x
CV-B4	x		x	E-7	x		x	HPeV-3	x
CV-B5	x		x	E-9	x		x	HPeV-4	x
CV-B6	x		x	E-11	x		x	HPeV-5	x
CV-A2	x			E-12	x		x	HPeV-6	x
CV-A7	x		x	E-13	x		x	HRV 1B	x
CV-A7	x	x	x	E-16	x		x		
CV-A9	x	x	x	E-17	x		x		
CV-A10	x	x	x	E-19	x	x	x		
CV-A13	x	x	x	E-20	x		x		
CV-A16	x	x	x	E-21	x		x		
CV-A21	x			E-25	x		x		
2876		x	x	E-26		x	x		
EV-8	x		x	E-27		x	x		
Rigvir E-7		x	x	E-29		x			
EV-71		x	x	E-33	x		x		
				E-34	x				

#### 4.3 Pan-enterovasta-aineiden testaukset

Pikornavirusvasta-aineiden testaukset tehtiin epäsuoralla IF-menetelmällä. Vasta-ainetestauksiin käytettiin Perkin-Elmer Vision 96-kuoppalevyjä (Kuva 10).



Kuva 10 Perkin-Elmer Vision Plate 96.

Soluja jaettiin 20 000 solua/kuoppa ja inkuboitiin yön yli konfluenssiin. Ennen vasta-aineiden värjäystä virukset fiksattiin 4 %:lla formaldehydillä ja käsiteltiin 0,2 %:lla Triton X-100:lla, koska se hajottaa solun membraania ja vasta-aineiden on helpompi päästä solun sisään.



Virusinfektiota varten vanha solumedium poistettiin kuopista ja niihin lisättiin 100 µl/kuoppa tuoretta mediumia. Viruslaimennokset määritettiin viruksien infektoivuuden perusteella titraamalla esim. 1:10; 1.1:100, 1:1000; ja 1:20. Kuoppalevyjä inkuboitii 6 h 37 °C:ssa (optimaalinen lämpötila enteroviruksille) lämpötilassa minkä jälkeen virukset fiksattiin 4 %:lla formaldehydillä. Kuoppalevyt inkuboitii huoneenlämmössä 15 min minkä jälkeen pestiin kuopat 3 x 5 min. PBS:llä. Lisättiin 0,2 % Triton X-100 ja inkuboitii 10 min. Kuopat pestiin samalla tavalla ja lopuksi lisättiin PBS:ää. Fiksatus kuoppalevyt säilytettiin jääkaapissa ennen värjäystä. Vasta-aineiden värjäykset tehtiin seuraavana päivänä.

Vasta-ainelaimennokset tehtiin 3 % BSA:han. Vasta-aineita käytettiin 1:200 laimennoksina 60 µl/kuoppa (määritetty empiirisesti). Kuoppalevyt inkuboitii 1 h huoneenlämmössä, pestiin kolme kertaa 0,05 % PBS Tween20:llä ja lisättiin sekundaarista vasta-ainelaimennosta. Inkuboitii 1 h huoneenlämmössä pimeässä ja toistettiin pesut. Värjätäkseen tumat lisättiin Hoechst-väriä 60 µl/kuoppa, joka laimennettiin 3 % BSA:han kuten vasta-aineet. Inkuboitii 10 min ja toistettiin pesut. Lopuksi lisättiin kuoppiin PBS:ää. Valmiit kuoppalevyt säilytettiin + 4 °C:ssa pimeässä (Liite 2 IF-ohjeet). Kuvassa 11 on esitetty eri viruksilla infektoitu kuoppalevy, jossa on merkitty infektion päivämäärä, aika ja fiksaus aika, käytetty solulinja, virukset ja niiden laimennokset ja testatut vasta-aineet.

									Virusinfektio päivä	Solut	Infektio	Fiksaus	
									140527	MRC5	10:45	16:45	
140527	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	MRC5	CV-B1	CV-B5	CV-A9	CV-A16	E-7	E-13	E-20	E-27	Rigvir E-7	EV-71		Meridian EV5
	ei virusta	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10	1.10	1.10		
B	CV-A7 m	CV-B2	CV-B6	CV-A10	E-1	E-9	E-16	E-21	E-32	EV-8	EV-71		
	1.100	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10		
C	CV-A9 m	CV-B3	CV-A3	CV-A13	E-2	E-11	E-17	E-25	E-33	EV-68	2876		
	1.100	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10		
D	CV-A9 r	CV-B4	CV-A7	CV-A14	E-5	E-12	E-19	E-26	E-6	EV-71	CV-A13		
	1.100	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10	1.100		
E	MRC5	CV-B1	CV-B5	CV-A9	CV-A16	E-7	E-13	E-20	E-27	Rigvir E-7	EV-71		Meridian VP1
	ei virusta	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10	1.10	1.10		
F	CV-A7 m	CV-B2	CV-B6	CV-A10	E-1	E-9	E-16	E-21	E-32	EV-8	EV-71		
	1.100	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10		
G	CV-A9 m	CV-B3	CV-A3	CV-A13	E-2	E-11	E-17	E-25	E-33	EV-68	2876		
	1.100	1.10	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10		
H	CV-A9 r	CV-B4	CV-A7	CV-A14	E-5	E-12	E-19	E-26	E-6	EV-71	CV-A13		
	1.100	1.10	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.100	1.10	1.100		

Kuva 11 Esimerkki pipetointikaaviosta.

#### 4.4 Kuvantaminen

Työssä käytettiin Turun yliopiston kuvantamiskeskuksen (Turku BioImaging) Zeiss Axiovert 200M- mikroskooppia (Kuva 12, Liite 3 Zeiss Axiovert 200M käyttöohjeet). Laite varattiin BTK:n sivuilta käyttäjätunnistein. Kuvat tallennettiin alkuperäisessä \*zvi muodossa, mikä on suositeltu muoto tuloksien analysointiin. Kuvien tarkasteluun tässä muodossa tarvitaan erikoisohjelmia kuten Carl Zeiss Zen tai vastaava. Kuvat tallennettiin myös \*tiff-formaatissa kolmessa muodossa (Dapi + Alexa488, Dapi ja Alexa488) muodossa, mikä säilyttää alkuperäisen intensiteetin ja resoluution. Tässä muodossa kuvat ovat myös laadullisesti sopivia tuloksien analysointiin, mutta siihen ei tarvita erikoisohjelmia. Käytetyt asetukset on siten hyvä tallentaa, jotta kullakin kuvauskerralla on mahdollista käyttää samoja asetuksia ja saada samannäköisiä kuvia (esim. A549 solut, Dapi exposure time 140 ms ja Alexa488 125 ms).

#### **Zeiss Axiovert 200M** (käänteismikroskooppi)



Zeiss Axiovert 200M

Cameras	ORCA 1394 ERG (b/w) Zeiss AxioCam MRc (colour)
FL filters	UV/Dapi GFP/FITC/Alexa488/CY2 TRITC/Alexa555/CY3 YFP (CFP) (CYS) (Fura-2)
Objectives	5x, 10x, 20x, 40x 63x Oil
Special	Live cell imaging High resolution mosaic imaging
Software	Axiovision Release 4.8

*Location: BioCity, 4th floor, room 4086 / Markku Saari.*

Kuva 12 Zeiss Axiovert 200M -käänteismikroskooppi (Lähde: [www.btk.fi/cell-imaging/instrumentation/widefield-microscopes/](http://www.btk.fi/cell-imaging/instrumentation/widefield-microscopes/), 3.11.2014).

## 5 TULOKSET

### 5.1 Tulokset

Pikornavirusvasta-aine Meridian EV5 tunnistaa coxsackievirus B1-5 -virustyypppejä, ja echovirus E-2,-12,-13,-16,-17,-20 -virustyypppejä. Meridian VP1 tunnistaa samat virustyyppit ja lisäksi coxsackievirus A13 -virustyyppiä. Mahdollisesti Meridian EV5 myös tunnistaa CV-A13:ta, mutta kuva epäonnistui. Dako 5-D8/1 tunnistaa edelleen coxsackievirus B1-5 virustyypppejä ja echovirus E-9,-12,-16 ja -17 virustyypppejä. Tulokset osoittavat, että Meridian EV5 ja VP1 vasta-aineiden tunnistusprofiili on laajempi kuin Dako vasta-aineen.

Vasta-ainekokeiden aikana havaittiin että MRC5-solut ja soluilla käytetyt pikornavirusvasta-aineet Meridian EV5 CO1669M ja Meridian VP1 CO1289 antoivat mikroskoopilla vihreän taustan, mikä vaikeutti tulosten käsittelyä. Samat virukset ja vasta-aineet tarkistettiin A549- ja RD-soluilla. Lisäksi näillä soluilla testattiin kolmas virusvasta-aine Dako M7064. Parechovirukset ja kolme virusvasta-ainetta tarkistettiin HT29-soluilla. Kuvantamisessa solutiheys oli liian suuri ja häiritsi tuloksien analysointia, ja tämän takia myöhemmissä kokeissa käytettiin vähemmän soluja.

Vasta-aineiden tulokset kerättiin taulukkoon 5, jossa esitetty, mikä virustyyppi oli infektoitu millekin solulinjalle ja millä laimennoksilla (taulukko 5). Positiivinen tulos on merkitty plussalla, negatiivinen miinuksella ja tulos joka oli epäselvä tai tulosta analysointia häiritsi taustaa merkitty taulukkoon plusmiinuksella.



Taulukko 5 Tulokset

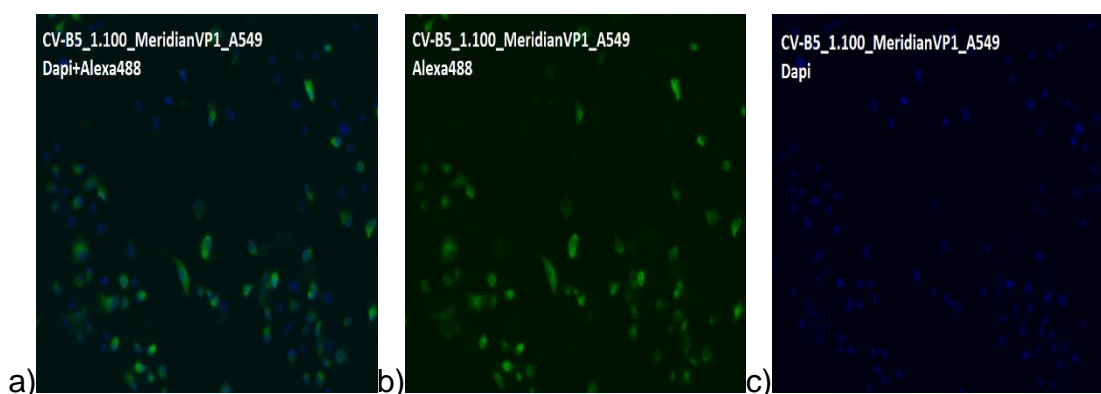
Virus	Vasta-aine IF-tulos (+, positiivinen; -, negatiivinen, +/-, taustaa), laimennos, esim. 1.10					
	MeridianEV5 CO1669M		MeridianVP1 C01289M		Dako M7064	
	A549	RD	A549	RD	A549	RD
CV-B1	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
CV-B2	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
CV-B3	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
CV-B4	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
CV-B5	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
CV-B6	+/-, 1.100		+/-, 1.100		+/-, 1.100	
CV-A2	-, 1.20		-, 1.20		-, 1.20	
CV-A7	+/-, 1.10		+/-, 1.10		-, 1.20	
CV-A9	+/-, 1.10		+/-, 1.10		-, 1.20	
CV-A10		+/-, 1.100		+/-, 1.100		-, 1.100
CV-A13	epäonnistui		+, 1.100		-, 1.100	
CV-A16	+/-, 1.10		+/-, 1.10		-, 1.20	
CV-A21	+/-, 1.10		+/-, 1.10		-, 1.20	
E-1	-, 1.100		+/-, 100		-, 1.1000	
E-2	+, 1.20		+, 1.20		+/-, 1.200	
E-5	+/-, 100		+/-, 100		-, 1.100	
E-7	+/-, 1.20		+/-, 1.20		+/-, 1.20	
E-9	+/-, 1.20		+/-, 1.20		+, 1.100	
E-11	+/-, 100		+/-, 100		-, 1.100	
E-12	+, 1.20		+, 1.20		+, 1.200	
E-13	+, 1.100		+, 1.100		+/-, 1.100	
E-16	+, 1.100		+, 1.100		+, 1.100	
E-17	+, 1.20		+, 1.20		+, 1.20	
E-19		+/-, 1.100		+, 1.100		-, 1.100
E-20	+, 1.10		+, 1.10		+/-, 1.100	
E-21	+/-, 1.20		+/-, 1.20		+/-, 1.20	
E-25	+/-, 1.20		+/-, 100		-, 1.100	
E-26		+/-, 1.100		+/-, 1.100		+/-, 1.1000
E-27		+/-, 1.20		+/-, 1.200		-, 1.20
E-29		+/-, 1.20		+/-, 1.20		-, 1.20
E-33	+/-, 1.20		+/-, 1.20		-, 1.20	
E-34	+/-, 1.20		+/-, 1.20		-, 1.20	
EV-8	+/-, 1.10		+/-, 1.10		-, 1.20	
EV-71		+/-, 1.20		+/-, 1.20		+/-, 1.20
	HT29		HT29		HT29	
HPeV-4	epäonnistui		epäonnistui		+, 1.100	

## 5.2 IF-kuvat

Kuvien yläkulmaan on merkitty infektoitu virustyyppi, käytetty laimennos, testattu vasta-aine ja käytetty solulinja. Kuvat saattavat erota toisistaan, koska ne on otettu eri päivinä.

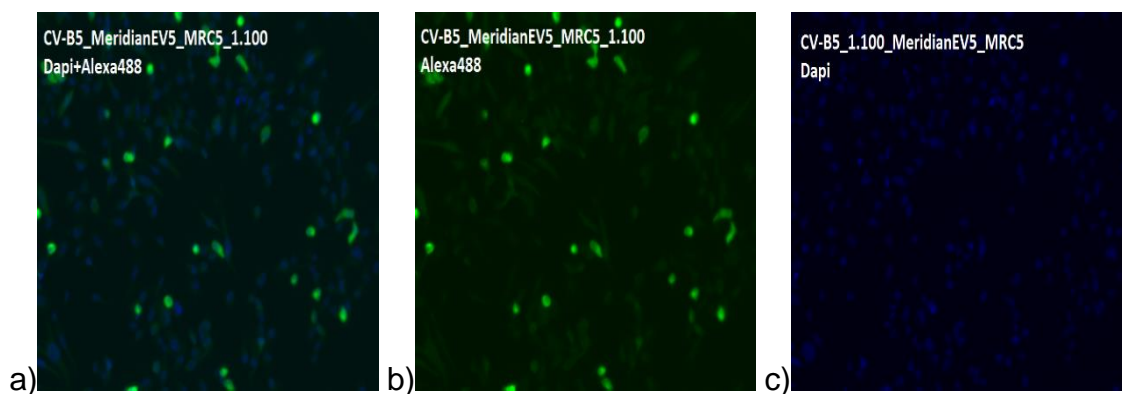
Tuloksien analysointia varten jokainen kuva sisältää kolme eri näkymää: a) molemmat filtterit (Dapi+Alexa488), jossa solujen tumat erottuvat kirkkaan sinisenä ja infektoituneet solut kirkkaan vihreänä tumma taustaa vastan, b) Alexa488 filtti, jossa infektiotapauksessa solut värjäytyvät vihreäksi ja negatiivisissa kuvissa näkymä b) on täysin tumma ja c) Dapi filtti, jossa vain siniset tumat. Vertaamalla kuvat saadaan tarkempi tulos.

Tulos katsottiin positiiviseksi jos useat solut erottuvat fluoresenssivihreänä, mutta muutamat solut jäävät infektoitumatta ja silloin ne toimivat kontrollina (Kuva 13).



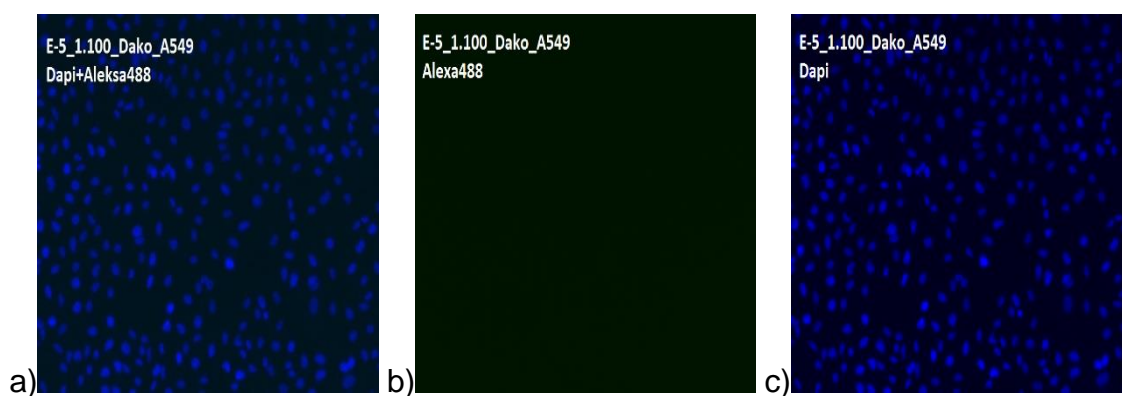
Kuva 13 Esimerkki positiivisesta tuloksesta. Meridian VP1 vasta-aine tunnisti coxsackie B5 virustyyppiä. Kuvassa infektoituneet solut erottuvat vihreänä (a) ja muutamat A549 solut (c) jäivät ehjinä (b).

Jos kaikki solut ovat vihreät kyseessä voi olla taustaa (Kuva 14). Silloin on vaikea sanoa ovatko kaikki solut infektoituneet ja positiiviset vai häiritsevän taustan takia tulos lasketaan vääräpositiiviseksi.



Kuva 14 Esimerkki taustakuvasta. Kuvassa (b) nähdään että kaikki solut ovat vihreät mikä voi tarkoittaa että kyseessä on vääräpositiivinen tulos.

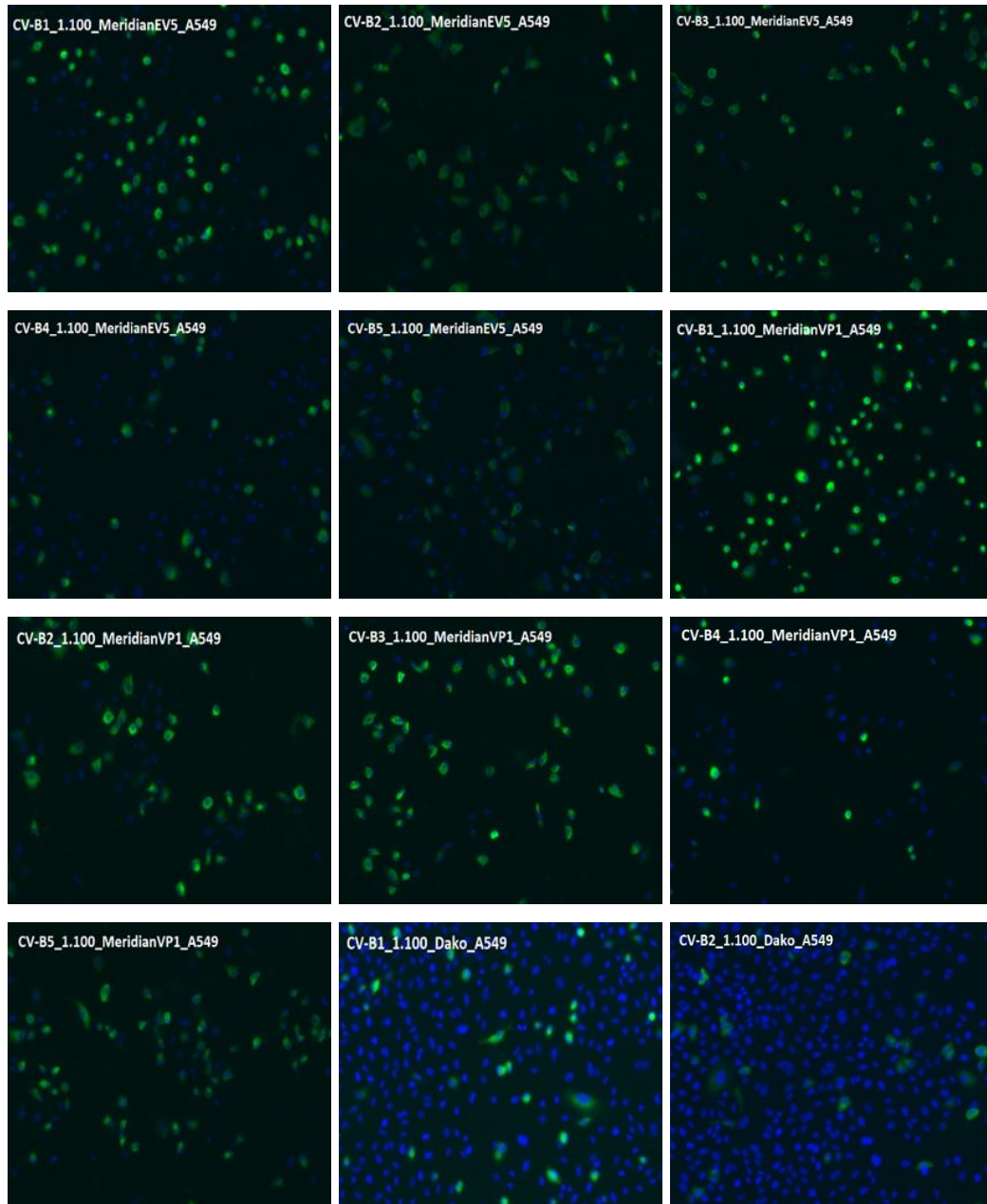
Negatiivisessa kuvissa ehjät solut erottuvat kirkkaana sinisenä ja immunofluoresenssi kuva on tumma (Kuva 15).

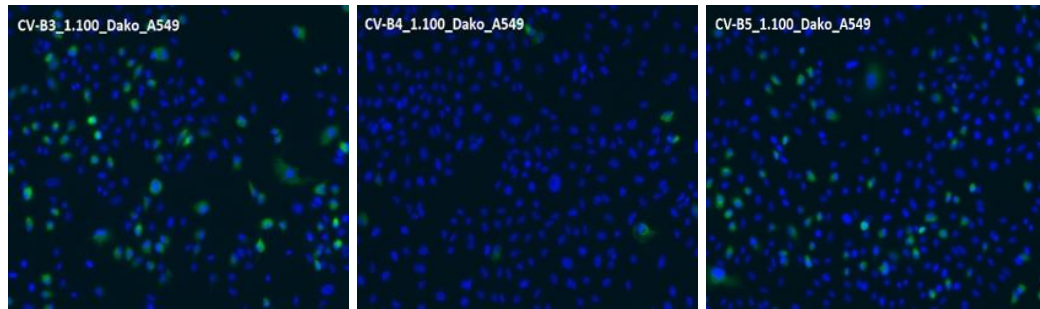


Kuva 15 Esimerkki negatiivisesta kuvasta. Kuvassa Dako vasta-aine ei tunnistanut E-5 virustyyppiä, immunofluoresenssi filteri on täysin tumma (b), vasta-ainetitoutumista ei tapahtunut.

### 5.2.1 Positiiviset IF-kuvat

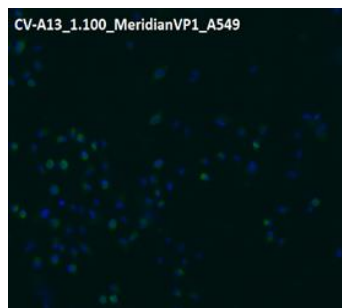
Vasta-aineet Meridian EV5, Meridian VP1 ja Dako 5-D8/1 tunnistivat coxsackievirus B1-5 virustyyppejä (Kuva 16).





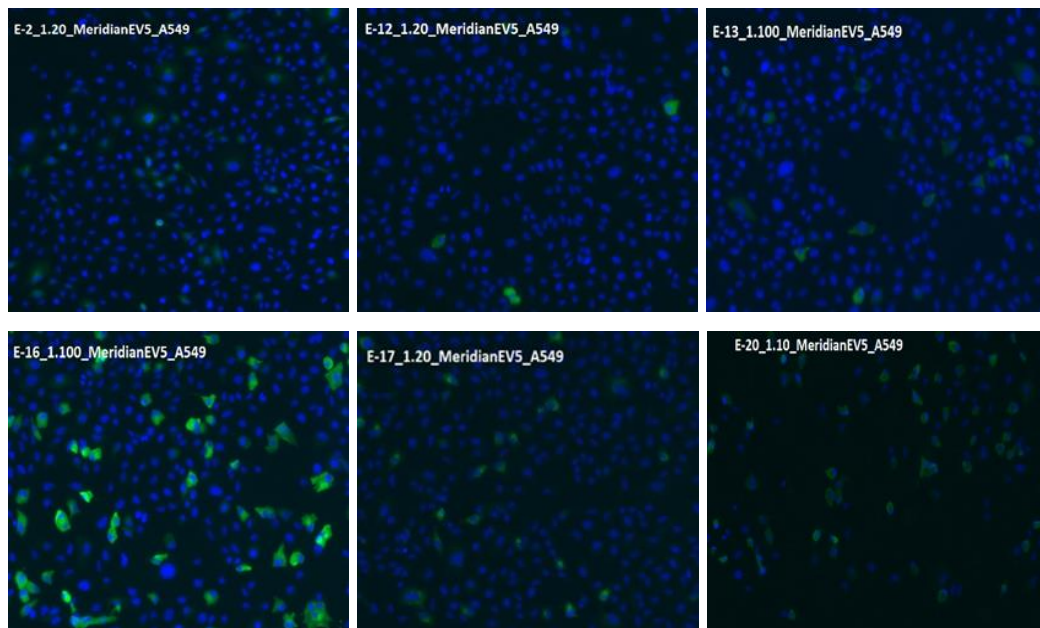
Kuva 16 Positiiviset tulokset: CV-B1-5\_Meridian EV5\_Meridian VP1\_Dako 5-D8/1.

Meridian VP1 vasta-aine tunnisti coxsackievirus A13 virustyyppiä (Kuva 17).

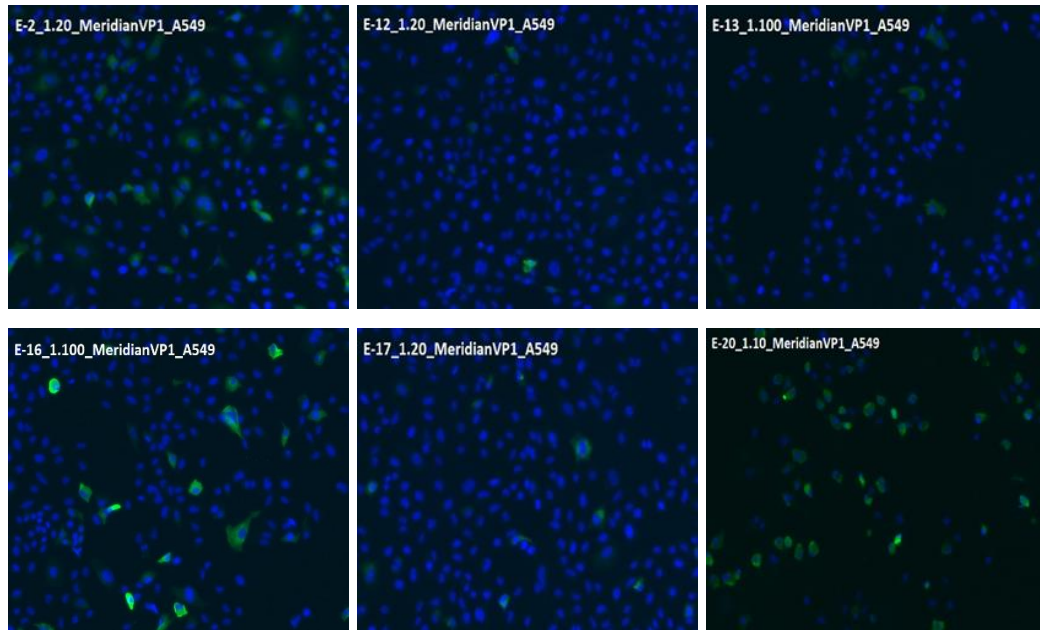


Kuva 17 Positiiviset tulokset: CV-A13\_Meridian VP1.

Vasta-aineet Meridian EV5 ja Meridian VP1 tunnistivat echovirus E-2,-12,-13,-16,-17,-20 virustyyppejä (Kuva 18).

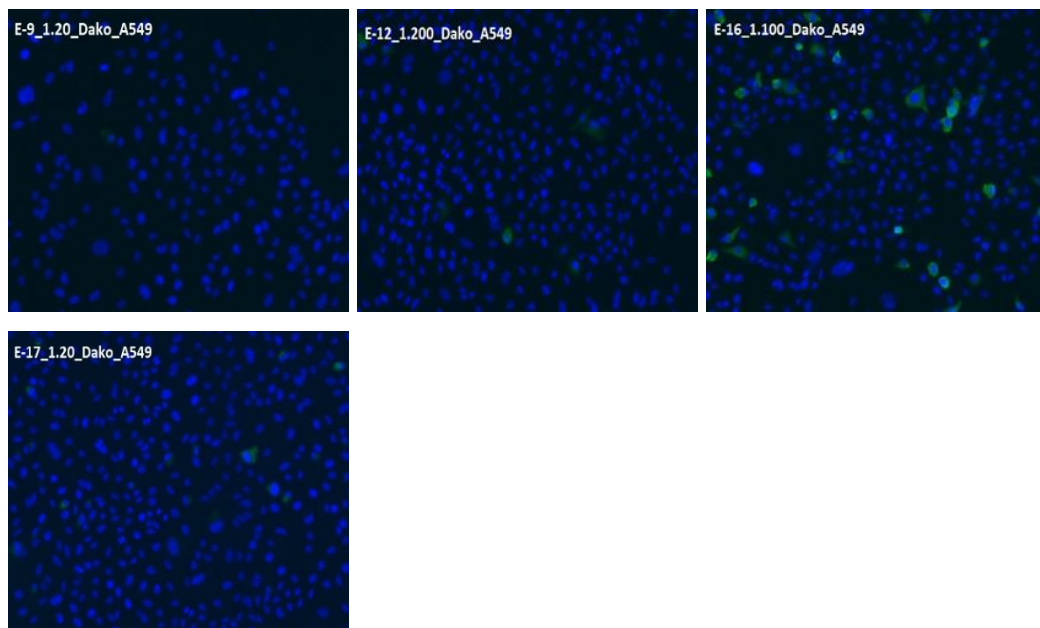






Kuva 18 Positiiviset tulokset: E-2,-12,-13,-16,-17,-20\_Meridian EV5\_Meridian VP1.

Dako 5-D8/1 tunnisti echovirus E-9,-12,-16 ja -17 virustyypppejä (Kuva 19).



Kuva 19 Positiiviset tulokset: E-9,-12,-16,-17\_Dako 5-D8/1.

## 6 PÄÄTELMÄT

Työssä käytettiin kolmea kaupallista pan-entero-vasta-ainetta Meridian EV5, Meridian VP1 ja Dako 5-D8/1 IF-menetelmällä. Vaikka IF-menetelmä ei yleensä käytetä enteroviruksien diagnostiikassa niiden moninaisen serotyypin takia, menetelmä voisi olla hyvä keino pikornaviruksia tunnistavien vasta-aineiden diagnostisissa tutkimustöissä. Pikornavirusten tunnistamiseksi kehitetään uusia ryhmäspesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita joiden oletetaan tunnistavan useita pikornavirustyyppiejä. Pikornavirusten pinnalla sijaitseva proteiini VP1 sisältää epitoppeja johon ryhmäspesifiset pikornavirusvasta-aineet sitoutuvat. Testatut pan-enterovasta-aineet eivät ole spesifisiä yhdelle virustyyppille, mutta saatujen tuloksien perusteella eivät pystyneet tunnistamaan useaa virustyyppiejä, mikä johtunee siitä, että pikornavirukset ovat pintarakenteiltaan ja sekvensseiltään erilaisia.

Pikornavirusvasta-aineet Meridian EV5, Meridian VP1 ja Dako 5-D8/1 tunnistivat eri pikornavirustyyppiejä (coxsackievirustyyppiejä B1-5 ja echovirustyyppiejä E-2,-9,-12,-13,-16,-17,-20) soluviljelmissä. Vasta-aineiden Dako 5-D8/1 ja Meridian VP1 tuotannossa (immunisoinnissa) käytettiin lämpöinaktivoitu ja puhdistettu coxsackievirus B5 virusta. Western blotit osoittavat että vasta-aineet reagoivat VP1-peptidiin jonka molekyylipaino on välillä 34–37 kDa. Meridian EV5 immunisoinnissa käytettiin EV viruslysaatti eli puhdistettua VP1 geeniä. Tuloksien perusteella immunisointimenetelmä ei vaikuttanut vasta-aineiden spesifisyyteen. Tutkimustulokset osoittavat, että pan-entero-virusvasta-aineet Meridian EV5 ja Meridian VP1 toimivat yhtä hyvin ja tunnistavat samat virustyyppit. Dako vasta-aine tunnistaa vähemmän virustyyppiejä edellisten verrattuna.

Dakoa on käytetty myös muissa julkaisuissa kuten Samuelson ym. (1995), Terletskaja-Ladwig ym. (2008), Miao ym. (2009) ja Richardson ym. (2013) julkaisuissa. Tässä työssä Dako toimi lähes samantapaisesti kuin yllä mainituissa tutkimuksissa. Kuten aiemmin oli todettu Dako 5-D8/1 kloonin tässäkin työssä tunnistaa useat HEV-B ryhmän virustyyppiejä, mutta ei reagoi HEV-A ryhmään.

Mahdollisesti vasta-aineet pystyvät tunnistamaan enemmän virustyypppejä koska saaduista kuvista on paljon sellaisia tuloksia mitkä vaikea analysoida ja päätellä häiritsevän taustan, liian suuren solumäärän, sopimattoman vasta-ainelaimennoksen tai muun syyn takia. Nämä vasta-aineet ja virukset kannattaa testata uudelleen sopivalla solumäärällä ja vasta-ainelaimennoksilla, myös viruslaimennokset kannattaa määrittää ennen vasta-ainekokeita. Tuloksien perusteella solumäärä kannattaa laittaa puolet vähemmän kuin käytettiin työssä esim. 10 000 solua/kuoppa. Testatut vasta-aineet käytettiin 1:200 laimennoksina mikä voi olla liian suuri laimennos ja infektoituneet solut näkyvät heikosti IF-kuvissa. Nämä vasta-aineet kannattaa testata uudelleen esim. 1:100 laimennoksina kuten esim. Terletskaia-Ladwig ym. (2008, 1000–1006) tutkimuksessa Dako vasta-ainetta käytettiin 1:100 laimennoksena. Työssä havaittiin, että MRC5 solut antavat taustaa kuvantamisessa kaikkiin vasta-aineisiin. Solut päätettiin olla käyttämättä ja virukset infektoitiin A549- ja RD- solulinjoille. A549 solulinja sopii usealle enterovirustyyppille. Parechoviruksille käytettiin HT29 solulinja. Työn tuloksia voidaan soveltuvin osin käyttää seuraavissa tutkimuksissa.



## LÄHTEET

Agneta Samuelson, Marianne Forsgren, Matti Sällberg, 1995. Characterization of the Recognition Site and Diagnostic Potential of an Enterovirus Group-Reactive Monoclonal Antibody. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, May 1995, p. 385–386.

Dako Monoclonal Mouse Anti-Enterovirus M 7064. Saatavissa: Dako 5 – D8 anti-mouse Pan-Enero\_pdf. Viit. 7.10.2014

Elena Terletskaia-Ladwig, Silvia Meier, Ralph Hahn, Michael Leinmuller, Franz Schneider and Martin Enders, 2008. A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* (2008), 57, 1000–1006.

Joseph Jollick, Jeff Houtz, Steve Ewers, 2007. Evaluation of the Diagnostic Hybrids D3 IFA Enterovirus Identification Kit for Culture Confirmation of Enterovirus. *Diagnostic Hybrids*, Athens, OH.

Gary P. Leonardi, Marie-Laure Desormeaux, 2009. A Rapid Microscopic Method for the Confirmation of Rhinoviruses in Cell Culture. *Intervirology* 2010; 53:426–428.

Lifetechnologies.com. Saatavissa: [www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A11001](http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A11001). Viit. 8.10.2014; [www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexafluor488.html](http://www.lifetechnologies.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexafluor488.html) Viit. 8.10.2014; [www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A11008](http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A11008). Viit. 8.10.2014

Lynn Yihong Miao, Christina Pierce, Sarah Peaslee, Carl Shaw, April Brandon, Nate Chapman, Jill DeLotell, Jimmy Page, David Scholl, 2007. Development of Diagnostic Pan-Enterovirus Monoclonal Antibodies Using VP1 Recombinant Proteins. *Diagnostic Hybrids*, Athens, OH.

Lynn Yihong Miao, Christina Pierce, Jennifer Gray-Johnson, Jill DeLotell, Carl Shaw, Nate Chapman, Elaine Yeh, David Schnurr, Yung T. Huang, 2009. Monoclonal Antibodies to VP1 Recognize a Broad Range of Enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 2009, p. 3108–3113.

M. Perez-Ruiz, J. M. Navarro-Mari, E. Palacios del Valle, M. Rosa-Fraile, 2003. Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by shell-vial assay. *Journal of Medical Microbiology* (2003), 52, 789–791.

Maria Teresa Barbani, Meri Gorgievski-Hrisoho, 2009. Rapid detection of respiratory picornaviruses in nasopharyngeal aspirates by immunofluorescence assay. *Journal of Clinical Virology* 45 (2009) 245–248.

Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus EV5 C01669M. Saatavissa: MAb enterovirus VP1\_C01669M\_pdf. Viit. 7.10.2014

Meridian Monoclonal Antibody to Enterovirus VP1 C01289M. Saatavissa: MAb enterovirus VP1\_C01289M\_pdf. Viit. 7.10.2014

Picornastudygroup.com. Saatavissa: [www.picornastudygroup.com](http://www.picornastudygroup.com). Viit. 3.6.2014; 10.6.2014

Picornaviridae.com. Saatavissa: [www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com). Viit. 3.6.2014; 10.6.2014; 25.5.2014

Sarah J. Richardson, Pia Leete, Shaline Dhayal, Mark A. Russell. Maarit Oikarinen, Jutta E. Laiho, Emma Svedin, Katharina Lind, Therese Rosenling, Nora Chapman, Adrian J. Bone, The nPOD-V Consortium, Alan K. Foulis, Gun Frisk, Malin Flodstrom-Tullberg, Didier Hober, Heikki Hyoty, Noel G. Morgan, 2013. Evaluation of the fidelity of immunolabelling obtained with clone

5D8/1, a monoclonal antibody directed against the enteroviral capsid protein, VP1, in human pancreas. *Diabetologia* (2014) 57:392–401.

Shigeo Yagi, David Schnurr, Jieyan Lin, 1992. Spectrum of Monoclonal Antibodies to Coxsackievirus B-3 Includes Type- and Group-Specific Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 1992, p. 2498-2501.

Solunetti.fi. Saatavissa: [www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely\\_1/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/soluviljely_1/). Viit. 2.10.2014; [www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/fluoresenssimikroskopia/2/). Viit. 7.10.2014; 3.11.2014 [www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunofluoresenssi/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunofluoresenssi/). Viit. 7.10.2014; [www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunosytoke-mia/2/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunosytoke-mia/2/). Viit 3.11.2014; [www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/). Viit. 3.11.2014

Susi, Petri. 2014. Diagnostic. Luentomateriaali.

Therapiafennica.fi. Saatavissa: [http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologien\\_diagnostiikka](http://therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Mikrobiologien_diagnostiikka). Viit. 7.10.14

Tobias J. Tuthill, Elisabetta Groppelli, James M. Hogle, David J. Rowlands, 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 343: 43–89.

Tuomi, Heidi. 2014. Soluviljely. Luentomateriaali.

ViralZone. org. Saatavissa: [www.viralzone.expasy.org](http://www.viralzone.expasy.org). Viit. 10.6.2014

## Pikornavirukset

Enterovirukset					Parechovirukset
coxsackie B	coxsackie A	echo	entero	rino	parecho
CV-B1	CV-A1	E-1	EV-8	HrV80	HPeV-1
CV-B2	CV-A2	E-2	EV- 68	HrV99	HPeV-2
CV-B3	CV-A3	E-4	EV-71	HRV1	HPeV-3
CV-B4	CV-A4	E-5		HRV2	HPeV-4
CV-B5	CV-A5	E-6		HRV3	HPeV-5
CV-B6	CV-A6	E-7		HRV12	HPeV-6
	CV-A7	E-9		HRV14	
	CV-A9	E-11		HRV16	
	CV-A10	E-12		HRV26	
	CV-A11	E-13			
	CV-A12	E-16			
	CV-A13	E-17			
	CV-A14	E-19			
	CV-A15	E-20			
	CV-A16	E-21			
	CV-A17	E-23			
	CV-A18	E-25			
	CV-A20	E-26			
	CV-A21	E-27			
	CV-A22	E-29			
	CV-A24	E-31			
		E-32			
		E-33			
		E-34			
		Rigvir E-7			

## Immunofluoresenssi: solukasvatus, fiksaus ja värjäys

Tarvittavat reagenssit ja laimennokset:

- Solut kasvatetaan 96-kuoppalevyllä n 60 % konfluenteiksi.
- Soluviljelymediumia.
- Trypan Blue solujen laskemiseen.
- Primääriset vasta-aineet viruksille: Meridian EV5 mAb to Enterovirus C01669M, Meridian VP1 mAb to Enterovirus CO1289M ja Dako M7064. Vasta-aineita käytettiin 1:200 laimennoksina. Laimennokset tehtiin suoraan käyttöpuskuriin.
- Sekundääriset vasta-aineet: Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) ja Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L). Käyttölaimennos 1:200.
- Tumavärjykseen Hoechst 33342 (1 mg/ml). Käyttölaimennos 1:200.
- 25 mM PBS (phosphate-buffered saline), pH 7,4.
- 4 % Formaldehydi PBS:ssä.
- 0,2 % Triton X-100 PBS:ssä (v/v).
- 3 % BSA PBS:ssä. Punnitse 3 g BSA:ta 100 ml:aan PBS:ää ja steriilisuo- data. Säilytä liuos + 4 °:ssa.
- PBS-T; PBS + 0,05 % Tween 20 (käytetään pesuihin).

### 1 Päivä

#### **Solujen kasvatus mustalla lasipohjaisella 96-kuoppalevyllä (työvaihe steriili laminaarikaapissa)**

- Irrota solut ja laske solumäärä: tee seos, jossa on 20 µl soluja + 80 µl trypanin sinistä, laita soluja burkerin kammioon ja laske mikroskoopilla solujen määrä.
- Tee solususpensio (10 – 20 000 solua/kuoppa) solumediumiin ja laita suspensiota 100 µl/kuoppa.
- Inkuboi solulevyjä + 37 °C:ssa yön yli.

### 2 Päivä

**Virusinfektio (kaikki vaiheet jäillä, laminaarissa, filtterikärjet)**

- Poista solumedium kuopista pipetoimalla kuopan reunasta; ei keskeltä!
- Lisää kuoppiin 100 µl tuoretta mediumia ja tee viruslaimennokset.
- Inkuboi 6 tuntia (37 °C enteroviruksille ja 33 °C rinoviruksille).
- Pese kerran jääkylmällä PBS:llä ja jatka fiksamiseen. Fiksaus (huoneenlämmössä ja laminaarissa).
- Poista PBS ja lisää 100 µl 4 % formaldehydiä (4 % FA PBS:ssä).
- Inkuboi 10–15 min huoneenlämmössä (kerä jäte vetokaapissa olevaan jätepulloon).
- Poista formaldehydi, pese 3 x 5 min. 200 µl PBS ja lisää 200 µl 0,2 % Triton X-100 PBS:ssä.
- Inkuboi 10 min. Poista Triton X-100 ja pese 3 x 5 min. 200 µl PBS-Tween 20:llä ja lisää 200 µl PBS:ää. Varastoi + 4 °C:een tai jatka värjäykseen.

**Värjäys huoneenlämmössä (ei tarvitse laminaaria)**

- Tee vasta-ainelaimennokset 3 % BSA:han (3 % BSA PBS:ssä) 1:200. Käyttölaimennokset on tarvittaessa testattava ennen käyttöä, sopivan laimennoksen löytämiseksi.
- Poista PBS kuopista ja lisää 60 µl primääristä vasta-ainelaimennosta (määritetty empiirisesti). Varo kuoppien kuivumista!
- Inkuboi huoneenlämmössä 1 h.
- Poista laimennos ja pese kuopat kolme kertaa 200 µl PBS-Tween 20:llä.
- Lisää 60 µl sekundääristä vasta-ainelaimennosta.
- Inkuboi 1 h huoneenlämmössä, PIMEÄSSÄ.
- Toista pesut kuten edellä.
- Värjätäksesi tumat, poista PBS kuopista, lisää Hoechst-väriä (laimennos 3 % BSA PBS:ssä, kuten vasta-aineet) 60µl kuoppiin ja inkuboi 5-10 min.
- Toista pesut ja lisää kuoppiin lopuksi 200 µl PBS:ää.
- Säilytä + 4 °C:ssa. PIMEÄSSÄ.

## **Kuvantaminen**

- Solujen kuvantamiseen käytetään Turun Biotekniikan keskuksen Zeiss Axiovert M200. Laite varataan BTK:n sivuilta erillisin käyttäjätunnistein ja laskutustiedoin.
- Kuvat käsitellään Carl Zeiss ZEN- ohjelmalla (tai vastaavalla).

## Zeiss Axiovert 200M käyttöohjeet

- Muista 30 min. sääntö! (lamppu pidetään päällä vähintään 30 min ja pois päältä vähintään 30 min ennen seuraava kytkemistä)
- Kytke mikroskooppi ja tietokone päälle ohjeiden mukaan (kytkentäjärjestys)
- Valitse okulaarit tai kamera
- Valitse objektiivi x10
- Fokusoi näyte (halogeenilamppu päällä)
- Valitse fluoresenssisuodatin
- Sammuta halogeenilamppu ja laita päälle fluoresenssivalo (FL shutter)
- Fokusoi näyte
- Avaa Live view ja säädä HD kameran asetukset (yritä minimisoida valotusaika ja säädä kontrasti)
- Ottaa kuva ja tallenna sopivassa formaatissa
  - Zeiss \*.zvi (raaka formaatti): suositeltu muoto
  - TIFF (alkuperäinen intensiteetti ja resoluutio): suositeltu laatu
  - JPG (pieni koko): ei ole suositeltava

## IF-kuvat

